



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

GENES *bla<sub>SHV</sub>* Y *bla<sub>TEM</sub>* EN CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS  
DE PACIENTES ATENDIDOS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO "ANTONIO  
PATRICIO DE ALCALÁ". CUMANÁ, ESTADO SUCRE  
(Modalidad: Tesis de Grado)

CARLOS ALBERTO HERNÁNDEZ MAGO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

Cumaná, 2013

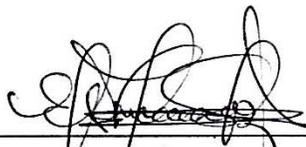
GENES *bla<sub>SHV</sub>* Y *bla<sub>TEM</sub>* EN CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS DE  
PACIENTES ATENDIDOS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO "ANTONIO  
PATRICIO DE ALCALÁ". CUMANÁ, ESTADO SUCRE

APROBADO POR:



---

Profa. Militza Guzmán Lista  
Asesora



---

Profa. Elsa Salazar de Vega  
Jurado principal



---

Profa. Hectorina Rodulfo  
Jurado principal

## ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
LISTA DE TABLAS .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	iv
RESUMEN .....	v
INTRODUCCIÓN .....	1
METODOLOGÍA .....	7
Cepas.....	7
Viabilidad e reidentificación bacteriana .....	7
Susceptibilidad antimicrobiana a los $\beta$ -lactámicos.....	7
Detección fenotípica de $\beta$ -lactamasas tipo AmpC, BLEE y metalo $\beta$ -lactamasas .....	10
$\beta$ -lactamasa cromosómica de tipo AmpC .....	10
$\beta$ -lactamasa de espectro extendido .....	10
$\beta$ -lactamasa de espectro extendido tipo GES.....	11
Carbapenemasa de tipo metalo- $\beta$ -lactamasa.....	11
Extracción del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) .....	11
Detección de los genes <i>bla</i> <sub>SHV</sub> y <i>bla</i> <sub>TEM</sub> .....	12
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	12
Análisis de los datos .....	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
CONCLUSIONES .....	28
RECOMENDACIONES .....	29
BIBLIOGRAFÍA .....	30
HOJA DE METADATOS .....	39

## DEDICATORIA

A

Dios todopoderoso, mis padres, mis hermanos, mis suegros, mi cuñada Lucia, su esposo José Rafael y, en especial, mi novia Aurinés, por todo su afecto, su apoyo, su ayuda desinteresada, por ser siempre un estímulo y nunca haber dejado de confiar en mí.

Mis amigos, en especial, a la Sra Antonia Gamboa, Gerardo Flores, Valmore Reyes, Andrés Rodríguez, Yuli Rodríguez, Loriannys Lastra, Nurexis Guzmán y Jaime Mora, por siempre contar con su amistad y apoyo en todo momento.

Todos mis compañeros estudiantes de bioanálisis, por ser inspiración y ejemplo de que sí se pueden alcanzar las metas propuestas y vencer todas las dificultades.

A todos mil gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

A

Mi asesora Dra. Militza Guzmán, por brindarme su ayuda y dedicación, por el conocimiento aportado en la realización de este trabajo de investigación.

Las Profesoras Elsa Salazar y Diorelis González, que junto a todos mis compañeros del laboratorio de bacteriología clínica y laboratorio de bacteriología molecular compartieron los arduos momentos que conllevaron a la realización de este trabajo de grado.

Todos los profesores y tutores que tuve a lo largo de la carrera por haber transmitido sus conocimientos, necesarios para mi formación como profesional del bioanálisis.

Proyecto LOCTI (Epidemiología de bacilos Gram negativos no fermentadores), por financiar parcialmente este trabajo de grado, a través de la Corporación Parque Tecnológico de Oriente (CPTO) Universidad de Oriente.

A todos sinceramente gracias.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de pacientes atendidos en las diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”, durante el periodo junio–diciembre de 2008. ....	8
Tabla 2. Frecuencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , según el tipo de muestra, aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”, durante el periodo junio–diciembre de 2008. ....	14
Tabla 3. Frecuencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , según el servicio, aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”, durante el periodo junio–diciembre de 2008. ....	15
Tabla 4. Fenotipos de resistencia presentes en las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”, durante el periodo junio–diciembre de 2008. ....	19
Tabla 5. Características de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> portadoras del gen <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , aisladas de pacientes atendidos en los diferentes servicios del Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”, durante el periodo junio–diciembre de 2008. ....	25

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución porcentual de la resistencia a los $\beta$ -lactámicos presentada por las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”, durante el periodo junio–diciembre de 2008. PIP: piperacilina, PTZ: piperacilina tazobactam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MER: meropenem.....	16
Figura 2. Distribución porcentual de la resistencia antimicrobiana según el número de $\beta$ -lactámicos afectados por las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”, durante el periodo junio–diciembre de 2008. ....	18
Figura 3. Producto de la reacción en cadena de la polimerasa obtenido de la amplificación del gen <i>bla</i> <sub>TEM</sub> en las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . M: Marcador de tamaño molecular Fermentans (GeneRuler™) (1kb), 1: <i>K. pneumoniae</i> (control positivo), 2: 6272.1, 3: 6437.1, 4: 8167.2, 5: 5104.1, 6: 4267, 7: <i>E. coli</i> J62-2 (Control negativo). ....	25

## RESUMEN

Se evaluó la presencia de los genes *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>* en *Pseudomonas aeruginosa*, para ello se utilizaron 47 cepas provenientes de pacientes atendidos en las diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”, Cumaná, estado Sucre, durante el periodo junio–diciembre de 2008. El género y la especie se confirmó mediante los protocolos convencionales para bacilos Gram negativos no fermentadores. La susceptibilidad antimicrobiana se evaluó por el método de difusión en disco y la producción de  $\beta$ -lactamasas, por los métodos de doble disco y disco combinado, siguiendo los lineamientos para bacilos Gram negativos no fermentadores establecidos por el instituto de estándares clínicos y de laboratorios (2012). La detección de los genes *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>* se realizó por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. El resultado de la susceptibilidad antimicrobiana demostró un alto porcentaje de cepas resistentes a imipenem (76,7%), seguido de piperacilina (74,5%), meropenem (72,3%), ceftazidima (70,2%), piperacilina-tazobactam y cefepima (63,8%), el menor porcentaje fue para aztreonam (38,3%). Se encontraron 11 fenotipos de resistencia, siendo el I (PIP, PTZ, CAZ, FEP, IMP, MER), el más frecuente (36,2%). Se detectó un 61,7% de cepas productoras metalo- $\beta$ -lactamasas y 66,0% productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. De los genes evaluados, sólo se detectó la presencia del gen *bla<sub>TEM</sub>* en cinco cepas, de las cuales, tres se ubicaron en el fenotipo I. De acuerdo con los resultados obtenidos, los genes *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>SHV</sub>* no son los principales responsables de conferir resistencia a los  $\beta$ -lactámicos, razón por la cual, se recomienda investigar otros genes que codifiquen para dicha resistencia.

**Palabra y/o frases claves:** Genes *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>*, *Pseudomonas aeruginosa*,  $\beta$ -lactámicos, BLEE,  $\beta$ -lactamasas

## INTRODUCCIÓN

El género *Pseudomonas* forma parte de un grupo heterogéneo de microorganismos conocidos como bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF), que son incapaces de fermentar los hidratos de carbono. Pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, la cual está ubicada en el orden Pseudomonadales. *Pseudomonas* sp. puede presentar de 1,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  de largo, y un diámetro de 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$ . Las especies de este género son móviles, debido a la presencia de uno o más flagelos polares, la mayoría de las especies tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 30 y 37°C, pero pueden sobrevivir y multiplicarse en un rango de temperatura de 20 a 42°C. Dentro de este género, la especie que clínicamente se aísla con mayor frecuencia es *Pseudomonas aeruginosa* (Martínez, 2007; Koneman *et al.*, 2008).

*P. aeruginosa* es un importante y frecuente patógeno oportunista causante de una serie de infecciones, tanto comunitarias como intrahospitalarias, las cuales son difíciles de tratar, en su mayoría, debido a la resistencia que, por lo general, presenta esta bacteria a los fármacos frecuentemente empleados en el tratamiento de las mismas (González *et al.*, 2007). A nivel mundial, se ha encontrado un aumento en los porcentajes de resistencia a los distintos antimicrobianos de uso terapéutico por parte de este microorganismo (Murillo *et al.*, 2009).

Entre los mecanismos bioquímicos de resistencia identificados en *P. aeruginosa* se encuentran, la alteración de la permeabilidad, dada por modificaciones estructurales en las proteínas de membrana externa, la sobreexpresión de bombas de expulsión y la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas (Bopp *et al.*, 2008).

*P. aeruginosa* es naturalmente resistente a múltiples antimicrobianos, debido principalmente, a la escasa permeabilidad de la membrana externa, presencia de una  $\beta$ -lactamasa cromosómica inducible tipo AmpC y la expresión constitutiva de diversos sistemas de expulsión activa, sobre todo MexAB-OprM (Hancock, 1998). La participación conjunta de estos tres mecanismos genera resistencia natural a una gran cantidad de antimicrobianos, tales como, las penicilinas, aminopenicilinas, incluidas las combinadas con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, cefalosporinas de primera, segunda y algunas de tercera generación, cloranfenicol, nitrofurantoína, sulfonamidas, trimetoprim, tetraciclina, novobiocina y ácido nalidíxico (Mesaros *et al.*, 2007).

Además de la resistencia natural, esta bacteria puede adquirir resistencia debido a la captación de elementos genéticos como plásmidos, transposones e integrones, que codifican para distintos determinantes de resistencia, tales como enzimas  $\beta$ -lactamasas (Vila y Marco, 2010).

Los  $\beta$ -lactámicos constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica, debido a que tienen propiedad bactericida lenta, a su escasa toxicidad; además, poseen un amplio margen terapéutico y actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Su espectro de acción se ha ido ampliando a lo largo de los años con la incorporación de nuevas moléculas, las cuales, confieren mayor actividad a los bacilos Gram negativos, entre ellos, *P. aeruginosa*; sin embargo, la efectividad de los mismos ha sido afectada por los distintos mecanismos de resistencia adquiridos por las bacterias (Marín y Gudiol, 2003; Giamarellou, 2005).

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico y dan lugar a la inactivación del antimicrobiano, éstas se clasifican atendiendo dos esquemas, la clase molecular de Ambler y clasificación

funcional de Bush Jacoby y Medeiros. Entre las principales enzimas detectadas se encuentran las clases A, C y D, que son serino  $\beta$ -lactamasas, y la clase B, llamadas metalo  $\beta$ -lactamasas. En *Pseudomonas* sp. se pueden encontrar los cuatro tipos de enzimas señaladas en la clasificación. Dentro de las  $\beta$ -lactamasas de la clase molecular A se encuentra el grupo 2b, que agrupa a las  $\beta$ -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) y las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) 2be (Garza *et al.*, 2009; Piersigilli *et al.*, 2009).

El grupo 2b incluye a las enzimas tipo TEM (Temoniera), donde se encuentran las TEM-1 y TEM-2, y a las enzimas tipo SHV (sulfhidrilo hidroxil variable), representadas por SHV-1. Estas enzimas hidrolizan la carbenicilina, ticarcilina y piperacilina (Garza *et al.*, 2009). Las  $\beta$ -lactamasas pertenecientes al subgrupo 2be se originan a partir de las 2b, debido a mutaciones puntuales ocurridas en el sitio activo, son responsables de la resistencia a carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, ceftazidima, cefepima, cefpirona y aztreonam, se inhiben con ácido clavulánico y tazobactam, pero su detección en el género *Pseudomonas* no es fácil, ya que puede ser enmascarada por la expresión de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica AmpC (Bush y Jacoby, 2010; Vila y Marco, 2010).

En *Pseudomonas* se han encontrado diferentes tipos de BLEE, tales como, TEM-4, TEM-21, TEM-24, TEM-42, TEM-116, SHV-2a, SHV-5 y SHV-12, adicionalmente, se han descrito otros tipos de enzimas pertenecientes a la clase 2be dentro de las que se encuentran las CTX-M (cefotaximasa Múnich), las cuales tienen una gran actividad hidrolítica frente a cefotaxima, sin embargo, algunas de sus variantes pueden hidrolizar a ceftazidima. PER (del inglés *Pseudomonas* extended resistance), y VEB (del inglés Vietnam extended spectrum  $\beta$ -lactamase), son BLEE identificadas en *Pseudomonas* sp. inhibibles por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, y confieren resistencia a ceftazidima, cefotaxima y aztreonam. CTX-M-1, CTX-M-44, CTX-M-92, PER-1,

VEB-1, VEB-1a, VEB-1b, VEB-2, han sido los tipos de enzimas identificadas con mayor frecuencia en este género (Naas *et al.*, 2008; Bush y Jacoby, 2010; Vila y Marco, 2010).

Otro tipo de BLEE que se ha encontrado en *P. aeruginosa* son las enzimas GES (del inglés Guiana extended spectrum), también denominadas IBC (del inglés integron borne cephalosporinase), pertenecen al grupo funcional 2f de la clasificación de Bush y Jacoby, presentan un perfil hidrolítico similar a otras BLEE de clase A de Ambler, son activas frente a penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro, pero son inhibidas por el ácido clavulánico, tazobactam, cefamicinas e imipenem. La primera BLEE de este grupo, denominada GES-1, se describió en una cepa de *K. pneumoniae* aislada en Francia (Poirel *et al.*, 2000). En la actualidad, se han descrito 16 variantes, que han sido identificadas en diferentes países a nivel mundial (Naas *et al.*, 2008; Mendonça *et al.*, 2009; Piersigilli *et al.*, 2009).

Chanawong *et al.* (2001) llevaron a cabo un estudio con el propósito de detectar la presencia de genes *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>SHV-5</sub>, *bla*<sub>SHV-2a</sub> y *bla*<sub>VEB-1</sub>, en 61 cepas de bacterias productoras de β-lactamasas tipo BLEE, aisladas en un hospital de Tailandia, entre ellas se estudiaron 18 cepas del género *Pseudomonas*, de las cuales, sólo una presentó el gen *bla*<sub>SHV-12</sub>, este fue el primer reporte de *P. aeruginosa* productora de *bla*<sub>SHV-12</sub> en Tailandia.

En la Habana, González *et al.* (2003) realizaron un estudio en 117 cepas de *P. aeruginosa*, con el objetivo de determinar si la resistencia a los β-lactámicos se encontraba mediada por plásmidos, hallando que, del total de cepas estudiadas, el 55,5% fueron productoras de β-lactamasas, y de éstas, el 63,3% presentaron el gen *bla*<sub>TEM</sub> en plásmidos conjugativos.

Mansour *et al.* (2009) ejecutaron un estudio en 70 cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes, aisladas de un hospital universitario en Túnez, con el fin de caracterizar fenotípica y molecularmente la presencia de BLEE. Del total de cepas analizadas, 7 resultaron fenotípicamente productoras de BLEE y genotípicamente presentaron el gen *bla*<sub>SHV-2a</sub>. Éste resultó ser el primer reporte de *P. aeruginosa* productoras de BLEE del tipo SHV-2a en Túnez.

Shahcheraghi *et al.* (2009) llevaron a cabo un trabajo de investigación con el objeto de determinar el patrón de susceptibilidad antimicrobiana, y la presencia de genes que codifican BLEE tipo VEB, PER, GES, SHV y TEM en 600 cepas de *P. aeruginosa*, obtenidas de pacientes internados en dos hospitales en Teherán. Los resultados revelaron que, 32,0% de las cepas fueron productoras de BLEE, 24,0% presentaron el gen *bla*<sub>VEB</sub>, 22,0% el *bla*<sub>SHV</sub>, 17,0% el *bla*<sub>PER</sub>, y 9,0% el *bla*<sub>TEM</sub>.

David *et al.* (2008) realizaron un estudio con la finalidad de caracterizar los mecanismos de resistencia presentes en 24 cepas de *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima y/o cefepima, provenientes de un hospital en Francia. Todas las cepas evaluadas presentaron el gen *bla*<sub>TEM-116</sub>, y 20,8% el gen *bla*<sub>TEM-116</sub> y *bla*<sub>SHV-2a</sub> simultáneamente.

Chikwendu *et al.* (2011), en Nigeria, investigaron sobre la resistencia antimicrobiana y la presencia de genes *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> en aislados de *Pseudomonas* sp. provenientes de muestras ambientales. Los autores encontraron que cerca del 90,0% de las cepas fueron resistentes a los antimicrobianos β-lactámicos ensayados y que el 16,7% de las mismas presentaron ambos genes.

La diseminación de genes de resistencia entre bacterias de una misma especie, y entre especies diferentes, ocurre frecuentemente en lugares donde

existe una alta presión selectiva, ejemplo de esto son los ambientes intrahospitalarios. Los trabajos de investigación sobre detección de los genes *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>* en cepas de *P. aeruginosa* en el país son prácticamente inexistentes, sin embargo, la presencia de estos genes han sido reportados en cepas de enterobacterias (Araque *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2006; Guzmán y Alonso, 2009; Perozo y Castellano, 2009; Marcano *et al.*, 2011).

En el Hospital Universitario "Antonio Patricio De Alcalá", los genes *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>* se han identificado en plásmidos conjugativos aislados de cepas de enterobacterias. Basado en el hecho de que los plásmidos conjugativos son elementos genéticos extracromosómicos de replicación independiente, portadores de una gran variedad de genes de resistencia, los cuales pueden ser transferidos entre géneros relacionados e incluso diferentes familias, se realizó el siguiente trabajo de investigación, con el fin de determinar la presencia de estos genes en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de pacientes atendidos en el Hospital Universitario "Antonio Patricio De Alcalá".

## METODOLOGÍA

### **Cepas**

Se estudiaron 47 cepas bacterianas escogidas de forma aleatoria, provenientes de una serie de 160 cepas de *P. aeruginosa* recolectadas durante el periodo comprendido entre junio y diciembre del 2008 e identificadas bioquímicamente por los métodos convencionales para bacterias Gram negativas no fermentadoras, propuestos por Koneman *et al.* (2008) (Tabla 1). Las cepas se aislaron a partir de muestras de sangre, orina y secreciones de pacientes con diagnóstico de infección e indicación de cultivo y antibiograma, internados atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”. Las 47 cepas bacterianas se encuentran conservadas en el laboratorio de Bacteriología Clínica del Departamento de Bioanálisis, Núcleo de Sucre.

### **Viabilidad e reidentificación bacteriana**

Con el propósito de determinar la viabilidad de las cepas, éstas se sembraron en caldo Luria-Bertani (LB) y se incubaron a 35°C, durante 18 horas. La identificación del género y la especie se confirmó mediante los protocolos convencionales para bacterias Gram negativas no fermentadoras, incluyendo pruebas bioquímicas como: oxidasa, oxidación/fermentación de carbohidratos (glucosa, manitol, maltosa y xilosa), motilidad, hidrólisis de la arginina, descarboxilación de la lisina, prueba de calentamiento a 42°C, hidrólisis de la urea y susceptibilidad a polimixina B (Koneman *et al.*, 2008).

### **Susceptibilidad antimicrobiana a los $\beta$ -lactámicos**

Se realizó mediante el método de difusión en agar, descrito por Bauer *et al.* (1966), siguiendo los lineamientos para bacilos Gram negativos no fermentadores, propuestos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios, del inglés: Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2012).

Tabla 1. Características de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes atendidos en las diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”, durante el periodo junio–diciembre de 2008.

Cepas	Servicio	Muestra	Terapia previa	Estadía (días)
4097	Medicina	Secreción	CIP, CLI	5
4138.1	UCI	Secreción	OXA, IMP	8
4267	UCI	Catéter	OXA, IMP	8
4341	Medicina	Secreción	AN	2
4408	Diálisis	Orina	(-)	5
4494	Medicina	Catéter	(-)	4
4509	Cirugía	Secreción	AN, CIP	8
4512	Medicina	Líquido	OXA	39
4522.1	Cirugía	Secreción	AN	6
4612	UCI	Secreción	AMP, AN, CIP	7
4803.2	UCI	Secreción	AMP, AN, CIP	7
4850	Pediatría	Secreción	PEN, OXA	6
4869	Medicina	Secreción	TZP	5
4903	UCI	Secreción	(-)	9
5024	Retén	Sangre	MEM, VAN	4
5045	Medicina	Secreción	CIP, CLI	9
5104.1	Cirugía	Secreción	CIP	28
5148.1	Medicina	Secreción	CIP, CLI	4
5153	Retén	Catéter	AMP	17
5189	Medicina	Secreción	OXA CAZ, CIP, CLI	3
5633	Pediatría	Catéter	CTX, VAN	5
5644	Medicina	Esputo	(-)	10
5656	UCI	Catéter	(-)	3
5710	UCI	Secreción	CTX	7
5887	Medicina	Esputo	PEN, FEP, CLI	4
6007.1	Medicina	Secreción	IMP, CIP	21
6069	Retén	Sangre	AMS	3
6090	Retén	Sangre	AMS	4
6092	Pediatría	Sangre	(-)	2
6222	Retén	Sangre	AMS	4
6257	Retén	Sangre	AMS	4
6271.1	Retén	Catéter	AMS	4
6272.1	Retén	Catéter	AMS	4
6357.2	UCI	Catéter	LVX	9
6392	Retén	Sangre	AMS	4

Tabla 1. (Continuación)

Cepas	Servicio	Muestra	Terapia previa	Estadía (días)
6415	Retén	Secreción	AMS, NET	6
6437.1	Retén	Sangre	AMS	12
6474	Retén	Sangre	AMS	7
6886.3	Medicina	Secreción	(-)	75
6898	Cirugía	Sangre	CTX, AN	3
7191.2	Medicina	Secreción	OXA	50
7370	Retén	Catéter	(-)	20
7834	UCI	Catéter	(-)	12
7842	Retén	Secreción	AMS	2
7865	Pediatría	Catéter	CTX, VAN	12
8167.2	Medicina	Secreción	CIP, CLI	4
8550.1	Medicina	Secreción	OXA, CIP	9

UCI: unidad de cuidados intensivos, (-): no tenía terapia antimicrobiana previa, PEN: penicilina G, AMP: ampicilina, AMS: ampicilina-sulbactam, OXA: oxacilina, TZP: piperacilina- tazobactam, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima, IMP: imipenem, MEM: meropenem, AN: amikacina, CIP: ciprofloxacina, CLI: clindamicina, VAN: vancomicina, LEV: levofloxacina.

Se preparó una suspensión bacteriana de la cepa en 4,5 ml de solución salina fisiológica estéril, a partir de un crecimiento de 18 horas, ajustado al patrón de 0,5 en la escala de MacFarland, correspondiente a  $1,50 \times 10^8$  UFC/ml. Una vez obtenida la turbidez, se impregnó un hisopo estéril en la suspensión y se diseminó sobre la superficie del agar Mueller Hinton (Himedia), dejando secar para colocar los discos de ceftazidima (30 µg), aztreonam (30 µg), cefepima (30 µg), piperacilina (100 µg), piperacilina-tazobactam (100/10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg) y ceftazidima/ácido-clavulánico (30/10 µg), todos de la marca OXOID. Las placas fueron incubadas a 35°C, durante 18 horas, en aerobiosis, posteriormente, se realizó la lectura de los halos de inhibición empleando una regla milimetrada.

El halo de inhibición observado en la cepa bacteriana ante cada antimicrobiano se interpretó según las categorías sugeridas por el CLSI (2012), como susceptible, intermedio y resistente. La calidad de los discos se verificó empleando la cepa control *Escherichia coli* American Type Culture Collection

(ATCC) 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

### **Detección fenotípica de $\beta$ -lactamasas tipo AmpC, BLEE y metalo $\beta$ -lactamasas**

Se ubicaron estratégicamente discos de piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepima, ceftazidima/ácido-clavulánico, imipenem, meropenem y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), siguiendo los esquemas propuestos por el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (2011), para detectar los siguientes mecanismos:

#### $\beta$ -lactamasa cromosómica de tipo AmpC

Se dispusieron los discos de ceftazidima e imipenem a 15 mm de distancia. La presencia de AmpC inducible se observó cuando entre los discos se presentó un halo truncado (Radice *et al.*, 2011), y la presencia de AmpC desreprimida al observar los discos ceftazidima, cefepima, y aztreonam resistentes, sin producción de BLEE (Picazo, 2000; Martínez, 2009).

#### $\beta$ -lactamasa de espectro extendido

Se empleó el método del disco combinado, la presencia de una zona de inhibición  $\geq 5$  mm en el halo formado entre los discos de ceftazidima/ácido clavulánico en comparación al producido por el de ceftazidima reveló la presencia de una posible BLEE inhibible por ácido clavulánico (Picazo, 2000; Martínez, 2009). También se utilizó el método de sinergia del doble disco, los discos de ceftazidima y cefepima se ubicaron a 15 mm del disco de amoxicilina/ácido clavulánico. Una distorsión en los halos de inhibición de cefepima y ceftazidima en la zona adyacente al disco de amoxicilina/ácido-clavulánico fue interpretado como posible presencia de BLEE (Jarlier *et al.*, 1988; Pasterán *et al.*, 2004).

### $\beta$ -lactamasa de espectro extendido tipo GES

Se emplearon los discos de ceftazidima e imipenem separados 15 mm de borde a borde, una distorsión del halo de inhibición del disco de ceftazidima en la zona adyacente al disco de imipenem sugirió la posible presencia de una BLEE tipo GES (Piersigilli *et al.*, 2009).

### Carbapenemasa de tipo metalo- $\beta$ -lactamasa

Para observar este fenotipo también se empleó el método de sinergia del doble disco, utilizando discos de imipenem y meropenem, los cuales se situaron a 15 mm del disco de EDTA  $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ /disco (2  $\mu\text{l}$  de solución de EDTA  $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$  pH 8,0 en discos de Whatman número 3). La presencia de metalo- $\beta$ -lactamasa se observó a través de la sinergia (distorsión del halo), entre los discos de imipenem y/o meropenem con el de EDTA (Radice *et al.*, 2011).

### **Extracción del Ácido Desoxirribonucleico (ADN)**

La extracción de ADN total se realizó empleando el estuche comercial Wizard Genomic (Promega), siguiendo las instrucciones de la casa fabricante. Se tomó 1,5 ml de caldo LB, inoculado con la cepa a estudiar, con 18 horas de crecimiento previo, se centrifugó durante 5 minutos a 5 000 g, luego se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 450,0  $\mu\text{l}$  de la solución de lisis de núcleo, se agitó suavemente. Se añadieron 3,0  $\mu\text{l}$  de solución de ARNasa, se homogenizó de 5 a 6 veces por inversión para ser incubadas a 80°C por 5 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos, para luego añadir 150,0  $\mu\text{l}$  de solución precipitante de proteínas. Se mezcló bien con vortex por 20 segundos y se incubó en hielo por 5 minutos. Seguidamente, se centrifugó a 12 000 g por 5 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante, cuidadosamente, a un tubo limpio, se añadieron 600,0  $\mu\text{l}$  de isopropanol y se centrifugó a 2 000 g por 15 minutos a 4°C. Después se descartó el isopropanol y se agregaron 600,0  $\mu\text{l}$  de etanol al 70,0% el cual, se centrifugó a 12 000 g por 3 minutos. Seguidamente, se decantó el etanol y se agregaron 100,0  $\mu\text{l}$  de

etanol al 95,0%, se decantó y se dejó secar a 37°C, con cuidado de no exceder el secado. Posteriormente, el sedimento se resuspendió en 50,0 µl de solución de rehidratación de ADN y se incubó a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Finalmente, se guardó a -20°C hasta su uso.

#### **Detección de los genes *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub>**

Para la búsqueda del gen *bla*<sub>SHV</sub> se emplearon los oligonucleótidos SHV-F: 5'-ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG-3' y SHV-R: 5'-CGT TTC CCA GCG GTC AAG G-3', los cuales permiten amplificar un producto de 840 pb (Brisse y Verhoef, 2001), y para el gen *bla*<sub>TEM</sub> los oligonucleótidos TEM-F: 5'-ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG-3' y TEM-R: 5'-CCA ATG CTT AAT CAG TGA GG-3', que amplifican un producto de 859 pb (Eckert *et al.*, 2004).

#### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Para la amplificación del gen *bla*<sub>SHV</sub> se utilizaron las siguientes condiciones: 12,5 µl de la mezcla Master MIX 2X (Promega), 2,0 µl de los oligonucleótidos específicos en cada caso, para una concentración final de 1 µmol.l<sup>-1</sup>, 2,5 µl de ADN y 6,0 µl de agua para completar un volumen de reacción 25 µl (Brisse y Verhoef, 2001; Eckert *et al.*, 2004).

Para el gen *bla*<sub>TEM</sub> se utilizó: 12,5 µl de la mezcla Master MIX 2X (Promega), 1,0 µl de cada uno de los oligonucleótidos específicos, para una concentración final de 0,5 µmol.l<sup>-1</sup>, 1,0 µl de ADN y 9,5 µl de agua hasta completar un volumen de reacción de 25 µl.

Las condiciones de reacción para ambos genes fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de una desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 45°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 2,5 minutos, durante 30 ciclos, con una extensión final de 72°C por 10 minutos (Guzmán y Alonso, 2009).

Como control positivo del gen *bla*<sub>SHV</sub> se empleó la cepa de *K. pneumoniae*

ATCC 700603, la cual presenta la enzima SHV-18. Como control positivo del gen *bla*<sub>TEM</sub> se empleó la cepa de *K. pneumoniae* M1, que presenta la enzima TEM-1.

Como control negativo para todas las reacciones de PCR, se empleó la cepa *E. coli* J62-2, que no presenta ninguno de los dos genes, y un segundo control negativo que consistió en mezclar todos los componentes sin ADN molde, utilizando agua para completar el volumen final de 25  $\mu$ l.

Los productos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 2,0%, el cual se preparó en buffer TBE 1X (stock 10X: tris base 0,9 mol.l<sup>-1</sup>, ácido bórico 0,9 mol.l<sup>-1</sup>, EDTA 0,02 mol.l<sup>-1</sup>, pH 8,0). Este buffer, además, se utilizó para realizar las migraciones electroforéticas (60 voltios durante una hora, aproximadamente) de los productos amplificados (Sambrook y Russell, 2001).

Para estimar el tamaño del fragmento de ADN amplificado, se utilizó el marcador ADN Fermentans (GeneRuler™) de 1 kb, el cual se colocó en el gel junto a las muestras y los controles de la PCR.

Los geles fueron coloreados con solución de bromuro de etidio 0,5 mol.l<sup>-1</sup> durante 5 minutos, el exceso se eliminó manteniendo el gel en agua durante 5 minutos. Los productos amplificados fueron detectados en el gel, mediante la observación a través de un transluminador de luz ultravioleta, para finalmente ser fotografiados y analizados.

### **Análisis de los datos**

Los resultados obtenidos fueron analizados y expresados porcentualmente en tablas y figuras (Dawson y Robert, 1997).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*P. aeruginosa* representa un importante problema de salud en los centros hospitalarios, especialmente, cuando causa infecciones en pacientes inmunosuprimidos, en recién nacidos o en aquellos que se encuentran en la unidad de cuidados intensivos, situación que se agudiza, debido a la resistencia natural y a su capacidad para adquirir mecanismos de resistencia, lo que la ubica como una bacteria de difícil tratamiento (Ajenjo, 2006; Poole, 2011).

En la tabla 2 se observa la frecuencia de *P. aeruginosa* según el tipo de muestra, el 46,8% se aislaron de secreciones de heridas, respiratorias, quirúrgicas y abscesos, seguida de puntas de catéter (23,4%), muestras de sangre (21,3%), muestras de esputo (4,3%), líquido pleural y orina (2,1%). Estos resultados muestran que el mayor porcentaje de las cepas de *P. aeruginosa* se aisló de infecciones de heridas e infecciones del torrente sanguíneo.

Tabla 2. Frecuencia de *Pseudomonas aeruginosa*, según el tipo de muestra, aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”, durante el periodo junio–diciembre de 2008.

Muestra	Número de cepa	Frecuencia (%)
Secreciones*	22	46,8
Catéter	11	23,4
Sangre	10	21,3
Esputo	2	4,3
Líquido pleural	1	2,1
Orina	1	2,1
TOTAL	47	100,0

\*Secreciones respiratorias, de heridas quirúrgicas y abscesos, %: porcentaje.

Al respecto, Martínez *et al.* (2007), en un estudio desarrollado en el hospital general San Jerónimo de Montería, Colombia, aislaron cepas de *P. aeruginosa* principalmente de muestras de secreciones (38,5%) y de catéteres

(11,5%).

Así mismo, Mago *et al.* (2004), en una investigación realizada en diferentes centros de salud del estado Nueva Esparta, sobre la frecuencia de *Pseudomonas* sp., encontraron mayor aislamiento de *P. aeruginosa* en muestras de secreciones (81,9%), seguido de catéteres (8,0%), y Rodríguez *et al.* (2005), en el Hospital Universitario de Caracas, reportan 53,5% de las cepas aisladas de secreciones, y el 12,1% de puntas de catéter.

En este estudio se obtuvo una mayor frecuencia de aislamiento en las áreas de medicina (31,9%) y retén (29,8%) (Tabla 3). Es posible que este hecho se deba a que el área de medicina, por tener un mayor número de camas, alberga un mayor número de pacientes que el resto de las unidades del hospital. Por otra parte, los neonatos que ingresan al servicio de retén presentan distintas condiciones, tales como bajo peso al nacer, prematurez, enfermedades congénitas, entre otras, las cuales constituyen factores predisponentes que favorecen el establecimiento de infecciones intrahospitalarias (Mammaia *et al.*, 2008).

Tabla 3. Frecuencia de *Pseudomonas aeruginosa*, según el servicio, aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”, durante el periodo junio–diciembre de 2008.

Servicio	Número de cepa	Frecuencia (%)
Medicina	15	31,9
Retén	14	29,8
UCI	9	19,2
Pediatría	4	8,5
Cirugía	4	8,5
Diálisis	1	2,1
Total	47	100,0

UCI: unidad de cuidados intensivos, %: porcentaje.

Hace, aproximadamente, 70 años se inicio el uso de los  $\beta$ -lactámicos en el

tratamiento clínico de las infecciones, y aún siguen siendo la primera opción terapéutica contra muchos microorganismos, entre ellos, *P. aeruginosa*, sin embargo, en los últimos años, se ha observado un incremento progresivo en la frecuencia de cepas de *P. aeruginosa* que se caracterizan por presentar una sensibilidad disminuida ante las penicilinas y cefalosporinas antipseudomónicas (Marín y Gudiol, 2003; Ruíz, 2007; Poole, 2011).

En la figura 1 se muestran los porcentajes de resistencia obtenidos en las cepas de *P. aeruginosa* a los antimicrobianos ensayados. El 76,7% fue resistente a imipenem, 74,5% a piperacilina, 72,3% a meropenem, 70,2% a ceftazidima, 63,8% a piperacilina-tazobactam y cefepima, respectivamente, y 38,3% a aztreonam.

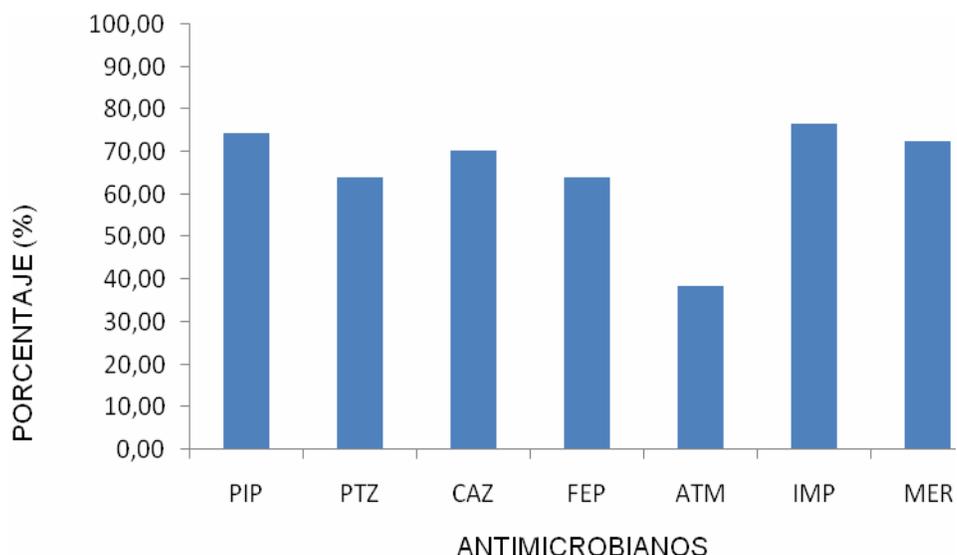


Figura 1. Distribución porcentual de la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos presentada por las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”, durante el periodo junio–diciembre de 2008. PIP: piperacilina, PTZ: piperacilina tazobactam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MER: meropenem.

Estos resultados evidencian que *P. aeruginosa* presentó altos porcentajes de resistencia contra los  $\beta$ -lactámicos de uso común en la práctica médica, tales

como, piperacilina, ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem y meropenem. Al respecto, Tam *et al.* (2010), al realizar un estudio en un hospital de Houston, y encontraron porcentajes de resistencia en *P. aeruginosa* superiores al 90,0% para penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas. Por su parte, Martínez *et al.* (2007), en un estudio realizado a 26 cepas de *P. aeruginosa* en un hospital de Colombia, reportaron un 69,2% de resistencia para ceftazidima, 61,5% para cefepima, 80,8% para aztreonam y 11,5% para imipenem y meropenem.

En contraposición a lo anteriormente expuesto, existen otros estudios donde se han reportado bajos porcentajes de *P. aeruginosa* resistente a los  $\beta$ -lactámicos (Cobo *et al.*, 2003, Gamero *et al.*, 2007, González *et al.*, 2007, Silva *et al.*, 2011). Las diferencias en cuanto a los porcentajes de resistencia pueden explicarse por el criterio que tiene cada centro hospitalario en cuanto al uso de los agentes antimicrobianos, y por diferencias geográficas.

La aparición de mecanismos de resistencia contra los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro hace difícil el manejo de los procesos infecciosos causados por *P. aeruginosa*, por lo cual, las opciones terapéuticas disponibles para tratar a los pacientes son muy limitadas, lo que trae como consecuencia un aumento en los porcentajes de morbilidad y mortalidad en los distintos centros hospitalarios (Guevara *et al.*, 2009).

La resistencia es un fenómeno muy dinámico y tiene múltiples causas, donde la más importante ha sido la exposición previa y uso indiscriminado de los antimicrobianos (Lasso, 2003). Según los datos epidemiológicos y clínicos, un 14,9% de los pacientes estaban siendo tratados con  $\beta$ -lactámicos antipseudomónicos antes del aislamiento de la cepa; aspecto que pone en evidencia la existencia de una presión selectiva y por ende la selección de cepas resistentes en el ambiente hospitalario.

Según el número de antimicrobianos a los cuales las cepas fueron resistentes, en la figura 2 se observa que el 8,5% de las cepas mostraron resistencia a un  $\beta$ -lactámico, 14,9% a un rango de 2 a 4, y 66,0% a 5 o más.

La resistencia en *P. aeruginosa* a los  $\beta$ -lactámicos resulta de la expresión de varios mecanismos bioquímicos, los cuales pueden presentarse simultáneamente; entre los más importantes están la inactivación de la droga por las  $\beta$ -lactamasas, la eliminación del compuesto a través de bombas de expulsión, y la inhibición de la entrada de los antimicrobianos a la célula por la impermeabilidad de la membrana externa. Estos mecanismos son regulados por un gran número de determinantes genéticos que modulan la susceptibilidad a estos antimicrobianos (Álvarez *et al.*, 2010).

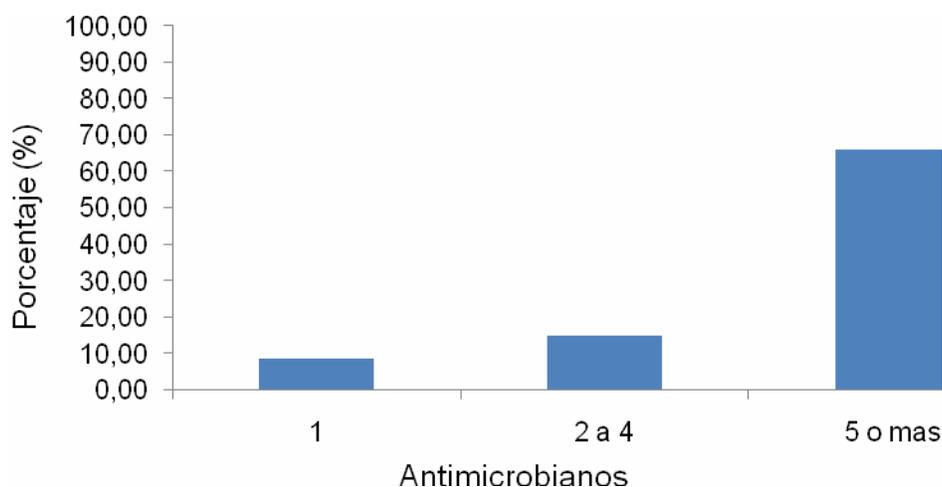


Figura 2. Distribución porcentual de la resistencia antimicrobiana según el número de  $\beta$ -lactámicos afectados por las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”, durante el periodo junio–diciembre de 2008.

El ensayo de la susceptibilidad antimicrobiana permitió detectar 11 fenotipos, 10 de éstos presentaron resistencia a, por lo menos, un  $\beta$ -lactámico, dichos fenotipos fueron designados arbitrariamente con números romanos y se denotaron teniendo en consideración el tipo de antimicrobiano que no presentó actividad para un aislado en particular (Tabla 4).

Los fenotipos que se presentaron con mayor frecuencia fueron el I, en el cual se ubicaron 17 cepas (4612, 4903, 5024, 5148, 5153, 5644, 5656, 6069, 6090, 6222, 6271.1, 6272.2, 6392, 6415, 6437.1, 6474, 8167.2), fenotipo III, 8 cepas (5633, 6886.3, 6898, 7191.2, 7370, 7834, 7842, 7865), y los fenotipos VI (4097, 4138.1, 4267, 5045), y IX (4869, 5189, 4408) en cuatro y tres cepas respectivamente.

Tabla 4. Fenotipos de resistencia presentes en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”, durante el periodo junio–diciembre de 2008.

Fenotipo	Perfil de resistencia	Nº cepas	AmpC	BLEE*	MBLs
I	PIP, PTZ, CAZ, FEP, IMP, MER	17	-	+	+
II	PIP, PTZ, CAZ, FEP, IMP	2	-	+	+
III	PIP, PTZ, CAZ, FEP, ATM, IMP, MER	8	-	+	+
III**	PIP, PTZ, CAZ, FEP, ATM, IMP, MER	2	-	-	-
IV	PIP, PTZ, CAZ, ATM, IMP, MER	2	-	+	+
V	PIP, PTZ, CAZ, ATM	1	+	+	-
VI	PIP, IMP, MER	4	+	-	-
VII	PIP, FEP, ATM	1	+	-	-
VIII	ATM, IMP, MER	1	+	-	-
IX	ATM	3	+	-	-
X	CAZ	1	-	+	-

PIP: piperacilina, PTZ: piperacilina tazobactam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MER: meropenem, BLEE: observación fenotípica de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido, MBLs: observación fenotípica de metalo  $\beta$ -lactamasa, AmpC: observación fenotípica de  $\beta$ -lactamasa cromosómica inducible de clase C. \* Detectado mediante técnica del disco combinado, \*\* Perfil de resistencia idéntico al III sin la observación fenotípica de AmpC, BLEE ni MBL.

Al respecto, *P. aeruginosa* presenta resistencia natural a muchos antimicrobianos, además, posee una extraordinaria capacidad para adquirir mecanismos de resistencia a través de mutaciones o por la captación de elementos genéticos como plásmidos o integrones, que codifican para la producción de BLEE tipo serino como son las  $\beta$ -lactamasas de la clase A y D de Ambler, y las metalo- $\beta$ -lactamasas de la clase B (Tato *et al.*, 2006; Vila y Marco, 2010).

Al analizar los posibles mecanismos de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos presentes en los diferentes fenotipos, se encontró la presencia de BLEE inhibibles por ácido clavulánico en los fenotipos tipo I, II, III, IV, V, y X. Es de hacer notar que, la producción de la enzima se detectó mediante la observación de una diferencia ( $\Delta$ ) entre el halo de ceftazidima/ácido clavulánico y ceftazidima mayor a 5 mm, ya que, por el método de doble disco no se encontraron cepas productoras de BLEE.

Las enzimas tipo BLEE se caracterizan por hidrolizar a las penicilinas, cefalosporinas (primera, tercera y cuarta generación), y al aztreonam, sin atacar a los carbapenemas, exceptuando las enzimas del grupo 2f (Strateva y Yordanov, 2009). Al analizar los perfiles de resistencia de las cepas que presentaron BLEE, se evidencian variaciones en diferentes sustratos. En el caso de los fenotipos I, y II, se encontró que las mismas son sensibles al aztreonam, por lo que se puede inferir, que la posible enzima tipo BLEE presenta una actividad catalítica de bajo nivel para este antimicrobiano.

Por otra parte, en los diferentes perfiles que presentan resistencia al aztreonam no se puede afirmar que ésta se deba exclusivamente a la producción de BLEE, ya que la resistencia en *P. aeruginosa* puede deberse a la combinación de diferentes mecanismos, es por ello que se debe considerar también la hiperproducción de la bomba de expulsión MexAB-OprM como responsable de conferir resistencia a aztreonam.

Al observar los diferentes perfiles de resistencia en las cepas productoras de BLEE, se puede denotar que en el fenotipo X se observa una disociación entre piperacilina y ceftazidima, característica representativa de las BLEE tipo GES, PER, VEB y OXA; mientras que el fenotipo V tiene un perfil de hidrólisis que induce a sospechar de una BLEE tipo ceftazidimaza (Vila y Marco, 2010).

Las enzimas tipo BLEE constituyen uno de los mecanismos de resistencia con mayor trascendencia clínica en la actualidad, estas se encuentran codificadas en cromosomas, plásmidos, e integrones, y por lo general, se presentan en bacilos Gram negativos incluyendo *P. aeruginosa*. Entre las BLEE descritas en *P. aeruginosa* se encuentran las enzimas de tipo OXA, VEB, PER, GES, CTX-M, TEM y SHV (Poirel *et al.*, 2004; Lezameta *et al.*, 2010; Radice *et al.*, 2011).

El análisis de los fenotipos I, II, III y IV, sugieren combinaciones de mecanismos enzimáticos, ya que asociado a la posible BLEE, también se observó la presencia de metalo- $\beta$ -lactamasas, las cuales serían responsables de la resistencia a imipenem y meropenem. Las metalo- $\beta$ -lactamasas son enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar a un amplio grupo de  $\beta$ -lactámicos como penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas. Las cepas de *P. aeruginosa* productoras de metalo- $\beta$ -lactamasas son las principales responsables de brotes epidémicos en los centros hospitalarios (Nicolau y Oliver, 2010).

El estudio fenotípico demostró que 61,7% de las cepas de *P. aeruginosa* fueron productoras de metalo  $\beta$ -lactamasas, característica que siempre se encontró asociada a la presencia de una BLEE. Las metalo  $\beta$ -lactamasas son las carbapenemasas de mayor importancia clínica y epidemiológica a nivel mundial, su detección es crucial para el óptimo tratamiento de los pacientes, especialmente en los críticos y hospitalizados. Varios autores recomiendan que tanto las cepas sensibles como resistentes a imipenem deben ser evaluadas para detectar la posible producción de metalo  $\beta$ -lactamasas mediante un sistema de rastreo con discos y EDTA, ya que esto garantizará la atención óptima del paciente, así como el control de la diseminación de la resistencia.

En Venezuela, Guevara *et al.* (2009) y Sánchez *et al.* (2008), han reportado cepas de *P. aeruginosa* productoras de metalo  $\beta$ -lactamasas aisladas

en diferentes hospitales de Venezuela. En ambos estudios las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas fueron productoras metalo  $\beta$ -lactamasas, y los estudios moleculares revelaron en todos los aislados la existencia de la enzima tipo VIM-2, la cual, es la única variante reportada en nuestro país.

Tovar (2008) realizó una investigación en 66 cepas de *P. aeruginosa* aisladas en el Hospital Universitario "Antonio Patricio De Alcalá" y un laboratorio clínico privado en la ciudad de Cumaná, estado Sucre, los resultados demostraron la producción fenotípica de BLEE y metalo  $\beta$ -lactamasas en 26,0%, y 11,0% de las cepas. La combinación de ambas se presentó en el 26% de las cepas. El análisis molecular reveló la presencia de *bla<sub>SHV</sub>* en el 4,0% y *bla<sub>VIM</sub>* en el 9,0%. Ambos genes se encontraron en solo una cepa.

Sivaraman *et al.* (2011) investigaron la presencia de BLEE y metalo- $\beta$ -lactamasas en 67 cepas de *P. aeruginosa*. Los resultados revelaron que 65,7% de los aislados fueron productores de metalo  $\beta$ -lactamasas, 19,4% de BLEE, y 6,0% fueron productoras de ambas enzimas.

El estudio de los diferentes mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* son de vital importancia, porque permite detectar de forma precoz la resistencia, para poder aplicar las medidas de prevención y control (Santella *et al.*, 2011). En esta investigación, las cepas que presentaron el fenotipo III\*\* se caracterizaron por mostrar resistencia a todos los  $\beta$ -lactámicos ensayados, sin la observación de BLEE ni de metalo- $\beta$ -lactamasas, hecho que permite sospechar de la acción de la enzima *K. pneumoniae* carbapenemasa (KPC), la cual, se caracteriza por hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos, sin ser afectada por los inhibidores ácido clavulánico y tazobactam (Corso *et al.*, 2011).

Para el reconocimiento fenotípico de KPC se recomienda realizar pruebas

basadas en el uso de inhibidores (ácido fenilborónico), y el método de Hodge modificado, el cual, si bien es cierto que para *P. aeruginosa* no está estandarizado o recomendado, existen publicaciones donde se proponen metodologías que han dado buenos resultados en cuanto a sensibilidad, especificidad y reproducibilidad (Navarro *et al.*, 2011; Pasterán *et al.*, 2011). Al respecto, tampoco puede descartarse en las cepas con el fenotipo VI la sobreexpresión de MexAB-OprM.

El análisis de mecanismos de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos en los fenotipos VI, VII, VIII y IX indican la existencia de mecanismos diferentes a la producción de enzimas tipo BLEE o metalo  $\beta$ -lactamasas. En principio, queda claro la expresión de la AmpC, la cual es evidente que está afectando la sensibilidad en estas cepas. Otro mecanismo posible que presenta *P. aeruginosa* es la presencia de bombas de expulsión activa tales como MexAB-OprM y MexXY-OprM, los cuales no solo afectan en menor o mayor medida a los  $\beta$ -lactámicos, sino también a las fluoroquinolonas y otros antimicrobianos. De igual forma, la impermeabilidad de la membrana juega un papel importante en la resistencia a los antimicrobianos, ya que modula la variación en el tamaño del poro y perturba la difusión del  $\beta$ -lactámico (Vila y Marco, 2010; Radice *et al.*, 2011).

Varios autores han notificado en *P. aeruginosa* la importancia de las bombas de expulsión activa y de la pérdida de porinas en la resistencia a los antimicrobianos (Tomás *et al.*, 2010; Cabot *et al.*, 2011). Sobre esto, Xavier *et al.* (2010) investigaron, en Brasil, la presencia de bombas de expulsión activa y su relación con la resistencia antimicrobiana en 59 aislados clínicos de *P. aeruginosa*, reportando la existencia de MexAB-OprM como responsable de la resistencia en el 50,8% de las cepas, y MexXY-OprM en el 27,1%.

La detección fenotípica de  $\beta$ -lactamasas sólo permite predecir la posible

clase de BLEE, dependiendo del fenómeno que se observe en el antibiograma, razón por la cual hay que recurrir a estudios moleculares para poder establecer el tipo específico de enzima. Desde el punto de vista molecular, la identificación de una  $\beta$ -lactamasa se realiza mediante la técnica de PCR, amplificando un determinado gen (Bonnet *et al.*, 2001).

Los genes que codifican para la síntesis de BLEE pueden estar localizados en el cromosoma bacteriano o bien en algún elemento genético como plásmidos, transposones e integrones, facilitando así su rápida diseminación. La adquisición de genes que codifican para BLEE, permite a las bacterias contar con uno de los principales mecanismos de resistencia para las cefalosporinas de tercera y cuarta generación e incluso el aztreonam (González *et al.*, 2012).

El estudio molecular realizado para detectar los genes *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> en las cepas de *P. aeruginosa*, reveló la presencia sólo del gen *bla*<sub>TEM</sub> en el 10,6% de las cepas (figura 3). En este trabajo de investigación no se encontraron genes *bla*<sub>SHV</sub> en las cepas de *P. aeruginosa* analizadas, sin embargo, diversos autores han demostrado la existencia del gen, principalmente, en Europa y Asia (Poirel *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2006; Nass *et al.*, 2008; Mansour *et al.*, 2009; Shahcheraghi *et al.*, 2009; Lin *et al.* 2012).

En la tabla 5 se muestra un resumen de las características más relevantes de las cepas que presentaron el gen *bla*<sub>TEM</sub>. En cuanto al fenotipo, se puede denotar que el gen se presentó con mayor frecuencia (3 casos) en cepas con el fenotipo I, las cuales fueron productoras de BLEE, cabe resaltar que, dos de ellas se aislaron de retén y una de medicina, este hecho hace pensar sobre la posibilidad de que un clon de *P. aeruginosa* esté circulando en los distintos servicios médicos del Hospital Universitario "Antonio Patricio De Alcalá", tal afirmación tendría que comprobarse aplicando otros métodos de tipificación,

preferiblemente genéticos, ya que, los estudios epidemiológicos mediante resultados de antibiograma carecen de sensibilidad. Al respecto, se puede inferir que este gen puede codificar para una TEM tipo BLEA o para una TEM tipo BLEE. En caso de ser un una posible BLEA, esta sería la responsable de la resistencia a piperacilina, y en caso de ser una BLEE la resistencia ante piperacilina, cefalosporina de tercera y cefepima estaría justificada.

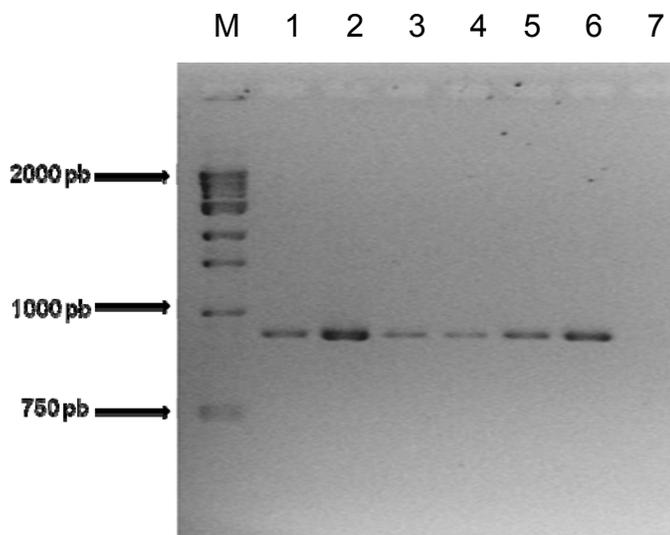


Figura 3. Producto de la reacción en cadena de la polimerasa obtenido de la amplificación del gen *bla*<sub>TEM</sub> en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. M: Marcador de tamaño molecular Fermentans (GeneRuler™) (1kb), 1: *K. pneumoniae* (control positivo), 2: 6272.1, 3: 6437.1, 4: 8167.2, 5: 5104.1, 6: 4267, 7: *E. coli* J62-2 (Control negativo).

Tabla 5. Características de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* portadoras del gen *bla*<sub>TEM</sub>, aisladas de pacientes atendidos en los diferentes servicios del Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”, durante el periodo junio–diciembre de 2008

Cepa	Perfil de resistencia	Muestra	Servicio	BLEE	Fenotipo
6272.1	PIP, PTZ, CAZ, FEP, IMP, MER	Catéter	Retén	+	I
6437.1	PIP, PTZ, CAZ, FEP, IMP, MER	Sangre	Retén	+	I
8167.2	PIP, PTZ, CAZ, FEP, IMP, MER	Secreción	Medicina	+	I
4267	PIP, IMP, MER	Catéter	UCI	–	VI
5104.1	PIP, FEP, ATM	Secreción	Cirugía	–	VII

PIP: piperacilina, PTZ: piperacilina tazobactam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima, ATM: aztreonam, IMP: imipenem, MER: meropenem, UCI: unidad de cuidados intensivos, +: positivo, -: negativo.

Al evaluar la presencia del gen *bla*<sub>TEM</sub> en la cepa 4267 y 5104, las cuales no son productoras de BLEE, se puede deducir que el gen detectado podría ser responsable de codificar una enzima tipo BLEA (TEM-1 o TEM-2), por su actividad hidrolítica frente a piperacilina. La caracterización molecular de la variante que codifica una  $\beta$ -lactamasa es difícil de establecer con tan sólo un PCR, a menos que, se trabaje con oligonucleótidos específicos para un gen en particular, es por ello que, en la gran mayoría de los trabajos de investigación, el tipo de gen se establece mediante análisis de secuenciación.

A nivel internacional, existen varios reportes sobre la detección del gen *bla*<sub>TEM</sub>, y *bla*<sub>SHV</sub> en *P. aeruginosa* (David *et al.*, 2008; Dubois *et al.*, 2008; Shahcheraghi *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2010). Al respecto, Poirel *et al.* (2004) realizaron un estudio en un hospital de Grecia, para determinar la presencia de genes responsables de codificar BLEE en *P. aeruginosa*, y detectaron la existencia de aislados relacionados genéticamente que portaban el gen *bla*<sub>SHV-5</sub> en su cromosoma. Jiang *et al.* (2006), en China, llevaron a cabo una investigación con el propósito de detectar la presencia de BLEE en 75 aislados clínicos de *P. aeruginosa*, encontrando la presencia del gen *bla*<sub>TEM-116</sub> en el 17,3% de las cepas y en ningún aislado el gen *bla*<sub>SHV</sub>.

Así mismo, Du *et al.* (2010), examinaron 48 aislados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes atendidos en varios hospitales de Taiwán, para determinar los mecanismos responsables de conferir resistencia a ceftazidima, encontrando que el 39,6% (19/48) de los aislados resistentes a ceftazidima, presentaban gen *bla*<sub>TEM-1</sub> y *bla*<sub>SHV-18</sub>. Dubois *et al.* (2008) investigaron, a través de estudios fenotípicos y moleculares, la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos en 86 cepas de *P. aeruginosa* provenientes de varios hospitales en Francia, el resultado reveló la presencia de cuatro cepas portadoras de los genes *bla*<sub>TEM-21</sub> y *bla*<sub>SHV-2a</sub>.

Los resultados de la presente investigación ponen de manifiesto la necesidad de investigar otros genes codificantes de  $\beta$ -lactamasas en las cepas de *P. aeruginosa* aisladas del Hospital Universitario "Antonio Patricio De Alcalá", sobre todo las tipo BLEE, debido a que estas constituyen un mecanismo de resistencia con alta implicancia epidemiológica, dado por su capacidad de diseminación horizontal (Ingold *et al.*, 2011). Sobre esto, Lin *et al.* (2012) realizaron un estudio molecular en cepas aisladas de pacientes asistidos en un hospital de Taiwan, donde reportaron que 37,1% de los aislados presentaban el gen *bla*<sub>TEM</sub> y además, que el 30,8% de las mismas también poseían los genes *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>GES</sub> y *bla*<sub>OXA</sub>.

Hou *et al.* (2012) caracterizaron aislados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de un hospital de China, donde encontraron que el 49,7% de los aislados presentaban diferentes genes codificantes para  $\beta$ -lactamasas, tales como, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA</sub> y *bla*<sub>GES</sub>.

Picao *et al.* (2009) estudiaron, en un hospital de Brasil, la diversidad de  $\beta$ -lactamasas producidas por *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima. Los autores, a través de estudios moleculares, determinaron que a pesar que ninguno de los aislados poseía el gen *bla*<sub>SHV</sub>, indicaron la presencia de los genes *bla*<sub>GES</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> en las cepas investigadas.

De los resultados obtenidos en el presente estudio se desprende que la resistencia observada en algunas de las cepas de *P. aeruginosa* se debe, en parte, a la presencia del gen *bla*<sub>TEM</sub>, quedando por dilucidar que otros mecanismos pudieran estar mediando tal resistencia aquí observada, por lo tanto, se recomienda la búsqueda de otros genes de resistencia, así como, la posible alteración de proteínas de membrana o mecanismos de expulsión.

## CONCLUSIONES

Los pacientes internados en el área de medicina y retén fueron los más afectados con infecciones por *P. aeruginosa*, siendo las secreciones y las puntas de catéter, con hemocultivos positivos, las muestras de donde se aisló dicho microorganismo preferentemente.

El mayor porcentaje de cepas resistentes se presentó ante imipenem, piperacilina, meropenem, ceftazidima, piperacilina-tazobactam y cefepima, siendo el aztreonam el antimicrobiano más eficiente contra *P. aeruginosa*.

Se detectó la producción de BLEE y metalo  $\beta$ -lactamasas en las cepas evaluadas, donde 61,7% de las cepas fueron productoras de ambas enzimas. La presencia de BLEE combinadas conlleva a la resistencia contra la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos.

Los genes *bla*<sub>TEM</sub>, y *bla*<sub>SHV</sub> no son los principales responsables de codificar  $\beta$ -lactamasas en las cepas de *P. aeruginosa*.

## RECOMENDACIONES

Promover en todo el personal que labora en el hospital la correcta ejecución de las normas de higiene hospitalaria, como el lavado de manos, el desecho de material contaminado, la desinfección de materiales, ya que estos factores muchas veces son responsables de la promoción de las infecciones y la diseminación de mecanismos de resistencia dentro del hospital.

Realizar estudios moleculares que permitan dilucidar otros genes codificantes de  $\beta$ -lactamasas en *P. aeruginosa*, así como la presencia de bombas de expulsión o impermeabilidad de la membrana.

## BIBLIOGRAFÍA

Ajenjo, M. 2006. Infecciones intrahospitalarias: conceptos actuales de prevención y control. *Revista Chilena de Urología*, 71(2): 95-101.

Álvarez, C.; Wiegand, I.; Olivares, J.; Hancock, R. y Martínez, J. 2010. Genetic determinants involved in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10): 4 159-4 167.

Araque, M.; Nieves, B.; Velázco, E. y Caldera, Z. 2000. Clonación y caracterización de los genes que codifican las  $\beta$ -lactamasas TEM-1 y SHV-5, aislados en cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de neonatos con septicemia nosocomial. *Biotechnología Aplicada*, 17(2): 94-98.

Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. y Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-496.

Bonnet, R.; Dutour, C.; Sampaio, J.; Chanal, C.; Sirot, D. y Labia, R. 2001. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-Gly. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(8): 2 269-2 275.

Bopp, D.; Einsfeld, A.; Graf, T. y Corçao, G. 2008. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e agua superficial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(5): 470-473.

Brisse, S. y Verhoef, J. 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* gene sequencing and automated ribotyping. *Institution Systemic Evolution and Microbiology*, 51: 915-924.

Bush, K. y Jacoby, G. 2010. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamasas. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54: 969-976.

Cabot, G.; Ocampo, A.; Tubau, F.; Marcia, M.; Rodríguez, C.; Moya, B.; Zamorano, L.; Suarez, C.; Peña, C.; Martínez, L. y Oliver, A. 2011. Overexpressing of AmpC and efflux pums In *Pseudomonas aeruginosa* isolate from bloodstream infections: Prevalence and impact on resistance in a spanish multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5): 1 906-1 911.

Chanawong, A.; M'Zali, F.; Heritage, J.; Lulitanond, A. y Hawkey, P. 2001. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended spectrum  $\beta$ -lactamases Gram negative bacteria isolated in a university hospital of Thailand. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, 48: 839-852.

Chikwendu, C., Ibe, S. y Okpokwasili, G. 2011. Detection of *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>TEM</sub>  $\beta$ -lactamase genes in multiresistant *Pseudomonas* isolates from environmental sources, *African Journal of Microbiology Research*, 5(15): 2 067-2 074.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Twentieth Informational Supplement M100-S21. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards. USA.

Cobo, F.; Bermúdez, P. y Manchado, P. 2003. Situación actual de la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4): 450-452.

Corso, A.; Guerriero, L.; Pasterán, F.; Ceriana, P.; Callejo, R.; Prieto, M.; Tuduri, E.; Lopardo, H.; Vay, C.; Smayervsky, J.; Tokumoto, M.; Álvarez, J.; Ramón, P. y Galas, M. 2011. Capacidad de los laboratorios nacionales de referencia en Latinoamérica para detectar mecanismos de resistencia emergentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 30(6): 619-626.

David, M.; Lemeland, J y Boyer, S. 2008. Emergence of extended spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: about 24 cases at Rouen University Hospital. *Pathologie Biologie*, 56: 429-434.

Dawson, S. y Robert, G. 1997. *Bioestadística Médica*. Editorial el Manual Moderno S.A. México.

Du, J.; Kuo, H.; Cheng, C.; Fei, C.; Wei, H. y Chang, S. 2010. Molecular mechanisms of ceftazidime resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine and human infections. *Veterinarni Medicina*, 55(4): 172-182.

Dubois, V.; Arpin, C.; Dupart, V.; Scavelli, A.; Coulange, L.; André, C.; Fischer, I.; Grobost, F.; Brochet, J.; Lagrange, I.; Dutilh, B.; Jullin, J.; Noury, P.; Larrivet, G. y Quentin, C. 2008.  $\beta$ -lactam and aminoglycoside resistance rates and mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French general practice (community and private healthcare centres). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62: 316-323.

Eckert, C.; Gautier, V.; Saladin-Allaard, M.; Hidri, N.; Verdet, C.; Ould-Hocine, Z.; Barnaud, G.; Delisle, F.; Rossier, A.; Lambert, T.; Philippon, A. y

Arlet, G. 2004. Dissemination of CTX-M type  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 1 249-1 255.

Gamero, M.; García, A.; Rodríguez, F.; Ibarra, A. y Casal, M. 2007. Sensibilidad y resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos. *Revista Española de Quimioterapia*, 20(2): 230-233.

Garza, U.; Silva, J. y Martínez, E. 2009. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Pública de México*, 51(3): 439-446.

Giamarellou, H. 2005. Multidrug resistance in Gram negative bacteria that produce extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Infections*, 11: 1-16.

González, A.; Salazar, D.; López, O.; Barrios, Z. y Martínez, A. 2007. Sensibilidad de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* frente a  $\beta$ -lactámicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41(1): 63-66.

González, A.; Salazar, D.; Rojas, N. y Hernández, Y. 2003. Resistencia a  $\beta$ -lactámicos mediada por plásmidos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen clínico. *Latin América Journal of Pharmacy*, 22(3): 231-238.

González, L.; Ramos, A.; Nadal, L.; Morffi, J.; Hernández, E.; Álvarez, A.; Marchena, J.; González, M. y Vallin, C. 2007. Identificación fenotípica y molecular de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido TEM y SHV producidas por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. aislados clínicos de hospitales. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 59(1): 52-58.

González, M.; Ribas, R.; Coria, R.; Donis, J. y Aparicio, G. 2012. Detección de la  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido OXA-141 en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 48: 690-697.

Guevara, A.; Ward, J. y Araque, M. 2009. Detección del gen *bla*<sub>VIM-2</sub> en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo  $\beta$ -lactamasas aisladas en una unidad de cuidados intensivos en Ciudad Bolívar, Venezuela. *Revista Chilena de Infectología*, 26(4): 336-341.

Guzmán, M. y Alonso, G. 2009. Caracterización de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*. Sucre, Venezuela. *Investigación Clínica*, 50(4): 419-431.

Hancock, R. 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other non fermentative Gram negative bacteria. *Clinical Infectology and Dissease*, 27: 93-99.

Hou, J.; Tong, Y.; Fei, J.; Guo, M.; Zhao, Y.; Bao, Q. y Zhou, T. 2012. The distribution and prevalence characteristics of extended spectrum  $\beta$ -lactamases and plasmid mediated AmpC genes among *Pseudomonas aeruginosa*. *Laboratory Medicine/Jianyan Yixue*, 27(1): 39-43.

Ingold, A.; Castro, M.; Nabón, A.; Borthagaray, G. y Márquez, C. 2011. Detección del gen codificante de la metalo- $\beta$ -lactamasa VIM-2 en un integrón de clase 1 asociado con el gen *bla*<sub>CTX-M-2</sub> en un aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* en el Uruguay: primera comunicación. *Revista Argentina de Microbiología*, 43: 198-202.

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". 2011. *Plantillas sugeridas para el antibiograma estandarizado*. Caracas-Venezuela.

Jarlier, V.; Nicolas, M.; Fournier, G. y Philippon, A. 1988. Extended broadspectrum  $\beta$ -lactamase conferring transferable resistance to newer betalactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, 10(4): 867-878.

Jiang, X.; Zhang, Z.; Li, M.; Zhou, D.; Ruan, F. y Lu, Y. 2006. Detection of extended spectrum  $\beta$ -Lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Microbiology*, 50(9): 2 990-2 995.

Koneman, E.; Allen, S.; Dowell, V.; Jonda, W.; Sommers, H. y Winn, W. 2008 *Diagnóstico microbiológico*. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana. México.

Lasso, M. 2003. Rotación de antimicrobianos en la Unidad de Terapia Intensiva: Es ésta una estrategia útil? *Revista Chilena de Infectología*, 20(1): 74-79.

Lezameta, L.; Gonzáles, E. y Tamariz, J. 2010. Comparison of four phenotypic methods to detect extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 27(3): 345-351.

Lin, S.; Liu, M.; Lin, C. y Shi. Z. 2012. Phenotypic detection and polymerase chain reaction screening of extended spectrum  $\beta$ -lactamases produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 45: 200-207.

Mago, O.; Betancourt, J., Castillo, E.; González, G. y Marín, G. 2004. Frecuencia de *Pseudomonas* spp. Grupo fluorescente provenientes de diferentes centros de salud del estado Nueva Esparta-Venezuela. *Kasmera*, 32(2): 80-88.

Mamma, C.; Di Carlo, P.; Cipolla, D.; Casuccio, A.; Tantillo, M.; Plano, M.; Mazzola, A y Corsello, G. 2008. Nosocomial colonization due to imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemiologically linked to breast milk feeding in a neonatal intensive care unit. *Acta Pharmacologica sinica*, 29(12): 1 486-1 492.

Mansour, W.; Dahmen, S.; Poirel, L.; Charfi, K.; Bettaieb, D.; Boujaafar, N. y Bouallegue, O. 2009. Emergence of SHV-2a extended spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital in Tunisia. *Microbial Drug Resistance*, 15(4): 295-301.

Marcano, D; De Jesús, A; Hernández, L y Torres, L. 2011. Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a  $\beta$ -lactámicos en aislados de enterobacterias, Caracas, Venezuela. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 30(6): 529-534.

Marín, M. y Gudiol, F. 2003. Antibióticos  $\beta$ -lactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(1): 42-45.

Martínez, D. 2009.  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29: 78-83.

Martínez, L. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Trabajo para optar al grado de Doctor. Departamento de Patología y Terapéutica Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, España.

Mendonça, N.; Ferreira, E. y Louro, D. 2009. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended and broadspectrum  $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34: 29-37.

Mesaros, N.; Nordmann, P.; Plésiat, P.; Roussel-Delvallez, M.; Van Eldere, J. y Glupczynski, Y. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millenium. *Clinical Microbiology and Infection*, 13: 560–578.

Murillo, J.; Sosa, L. y López, G. 2009. Patrón de Resistencia Antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* en el Hospital General de Culiacán. *Sociedad Médica del Hospital General de Culiacán "Dr. Bernardo J. Gastélum"*, 3(2): 6-11.

Naas, T.; Poirel, L. y Nordmann, P. 2008. Minor extended spectrum  $\beta$ -lactamasas. *Clinical Microbiology and Infectology*, 14(1): 42-52.

Navarro, F.; Calvo, J.; Cantón, R.; Fernández, F. y Mirelis, B. 2011. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos Gram negativos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(7): 524-534.

Nicolau, C. y Oliver, A. 2010. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(1): 19-28.

Pasterán, F.; Guerreiro, L.; Goris, V.; Sujemeckis, A.; Faccone, D. y Campos, K. 2004.  $\beta$ -Lactamasa de espectro extendido (BLEE) GES-1 en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de Argentina: Evaluación de métodos fenotípicos para su detección. Resumen. XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología. X Congreso Argentino de Microbiología. Asociación Argentina de Microbiología.

Pasterán, F.; Veliz, O.; Rapoport, M.; Guerriero, L. y Corso, A. 2011. Sensitive and specific modified Hodge test for KPC and metallo  $\beta$ -lactamase. Detection in *Pseudomonas aeruginosa* by use of a novel Indicator strain, *Klebsiella Pneumoniae* ATCC 600703. *Journal of Clininal Microbioogy*, 49(12): 4 301-4 303.

Perozo, A. y Castellano, M. 2009. Detección de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en cepas de la familia Enterobacteriaceae. *Kasmera*, 37(1): 35-37.

Picao, R.; Poriel, L.; Gales, A. y Nordmann, P. 2009. Diversity of  $\beta$ -lactamasas produced by ceftazidima resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9): 3 908- 3 913.

Picazo, J. 2000. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (SEIMC).

Piersigilli, A.; Enrico, M.; Bongiovanni, M.; Bilbao, L.; Martínez, G. y Ledesma, E. 2009. Aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en un centro privado de Córdoba. *Revista Chilena de Infectología*, 26(4): 331-335.

Poirel, L.; Lebessi, E.; Castro, M.; Fèvre, C.; Foustoukou, M. y Nordmann, P. 2004. Nosocomial Outbreak of extended spectrum  $\beta$ -lactamase SHV-5 Producing Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6): 2 277-2 279.

Poirel, L.; Naas, T.; Nicolas, D.; Collet, L.; Bellais, S.; Cavallo, J. y Nordmann, P. 2000. Characterization of VIM-2, a carbapenem hydrolyzing metallo  $\beta$ -lactamase and its plasmid and integrón borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(4): 891-897.

Poole, K. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*, 2(65): 1-13.

Radice, M.; Marín, M.; Giovanakis, M.; Vay, C.; Almuzara, M.; Limansky, A.; Casellas, J.; Famiglietti, A.; Quinteros, M.; Bantar, C., Galas, M.; Kovensky, J.; Nicola, F.; Pasterán, F., Soloaga, R. y Gutkind, G. 2011. Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos Gram negativos no fermentadores de importancia clínica: recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología. *Revista Argentina de Microbiología*, 43: 136-153.

Rodríguez, G.; Bastidas, P.; Flores, L.; Villaroel, E.; Rivero, N. y Navarro, P. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el Hospital Universitario de Caracas: Sensibilidad antimicrobiana. *Vitae Academia Biomédica Digital*. <http://caibco.ucv.ve>. (15/07/2012).

Ruíz, L. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Trabajo de postgrado. Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, España.

Sambrook, L. y Russell, D. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. Tercera edición. Cold Spring Harbor. New York.

Sanchez, D.; Marcana, D.; Spadola, E.; León, L.; Payares, D.; Ugarte, C.; Salgado, N.; Maggi, G.; Guevara, A.; Torres, S.; Rodríguez, J.; Flores, A. y Tarazona, B. 2008. Metaloenzimas tipo VIM detectadas en aislamientos clínicos en *Pseudomonas aeruginosa* en cuatro hospitales de Venezuela. *Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*, 39(2): 17-22.

Santella, G.; Pollini, S.; Docquier, J.; Almuzara, M.; Gutkind, G.; Rossolini, G. y Radice, M. 2011. Resistencia a carbapenemas en aislamientos de

*Pseudomonas aeruginosa*: un ejemplo de interacción entre distintos mecanismos. *Revista Panamericana de la Salud Pública*, 30(6): 545-548.

Shahcheraghi, F.; Nikbin, V. y Feizabadi, M. 2009. Prevalence of extended spectrum  $\beta$ -lactamases genes among multidrug resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in Tehran. *Microbial Drug Resistance*, 15(1): 37-39.

Silva, F.; Cifuentes, M. y Pinto, M. 2011. Resultados de la vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana en Chile: Consolidando una red. *Revista Chilena de Infectología*, 28(1): 19-27.

Sivaraman, U.; Noyal, J.; Kandha, K.; Joshy, E.; Shailesh, K.; Selvaraj, S.; Sreenivasan, S. y Sruthi, R. 2011. Detection of extended spectrum  $\beta$ -lactamases, AmpC  $\beta$ -lactamases and metallo  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of ceftazidime resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 1 284-1 288.

Strateva, T y Yordanov, D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medicine and Microbiology*, 58: 1 133-1 148.

Tam, V.; Chang, K.; Abdelraouf, K.; Brioso, C.; Ameka, M.; McCaskey, L.; Weston, J.; Caeiro, J. y Garey, K. 2010. Prevalence, resistance mechanisms, and susceptibility of multidrug resistant bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3): 1 160–1 164.

Tato, M.; Valverde, A.; Coque, T. y Canton, R. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de PER-1 en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(7): 469-474.

Tomás, M.; Doumith, M.; Warner, M.; Turton, J.; Beceiro, A.; Bou, G.; Livermore, G. y Woodford, N. 2010. Efflux pumps, OprD porin, AmpC  $\beta$ -lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5): 2 219-2 224.

Torres, L.; Gagliotta, V.; Torres, O.; Benítez, M.; Domínguez, M. y Pedrosa, R. 2006.  $\beta$ -lactamases de espectro extendido en Enterobacterias aisladas en centros de salud de Caracas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 26(2): 365-378.

Tovar, E. 2008. Susceptibilidad antimicrobiana y detección de genes de resistencia para la producción de  $\beta$ -lactamases en cepas de *Pseudomonas*

*aeruginosa* aisladas de muestras clínicas. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Vila, J. y Marco, F. 2010. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos Gram negativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28: 726-736.

Xavier, D.; Picão, R.; Girardello, R.; Fehlberg, L. y Gales, A. 2010. Efflux pumps expression and its association with porin down regulation and  $\beta$ -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *Biology and Medicine Central Microbiology*, 10: 210-217.

## HOJA DE METADATOS

### Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

<b>Título</b>	Genes <i>Bla<sub>shv</sub></i> Y <i>Bla<sub>tem</sub></i> en cepas de <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> aisladas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario "Antonio Patricio De Alcalá". Cumaná, estado sucre
<b>Subtítulo</b>	

#### Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
<b>Hernández, M. Carlos, A.</b>	<b>CVLAC</b>	15 289 516
	<b>e-mail</b>	calhema@hotmail.com
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	

#### Palabras o frases claves:

GENES <i>blashv</i> Y <i>bla<sub>TEM</sub></i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
β-lactamasas
BLEE
β-lactámicos

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
CIENCIAS	BIOANALISIS
	Bacteriología

### Resumen (abstract):

Se evaluó la presencia de los genes *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>* en *Pseudomonas aeruginosa*, para ello se utilizaron 47 cepas provenientes de pacientes atendidos en las diferentes áreas del Hospital Universitario “Antonio Patricio De Alcalá”, Cumaná, estado Sucre, durante el periodo junio–diciembre de 2008. El género y la especie se confirmó mediante los protocolos convencionales para bacilos Gram negativos no fermentadores. La susceptibilidad antimicrobiana se evaluó por el método de difusión en disco y la producción de  $\beta$ -lactamasas, por los métodos de doble disco y disco combinado, siguiendo los lineamientos para bacilos Gram negativos no fermentadores establecidos por el instituto de estándares clínicos y de laboratorios (2012). La detección de los genes *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>* se realizó por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. El resultado de la susceptibilidad antimicrobiana demostró un alto porcentaje de cepas resistentes a imipenem (76,7%), seguido de piperacilina (70,7%), meropenem (72,3%), ceftazidima (70,2%), piperacilina-tazobactam y cefepima (63,8%), el menor porcentaje fue para aztreonam (38,3%). Se encontraron 11 fenotipos de resistencia, siendo el I (PIP, PTZ, CAZ, FEP, IMP, MER), el más frecuente (36,2%). Se detectó un 61,7% de cepas productoras metalo- $\beta$ -lactamasas y 66,0% productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. De los genes evaluados, sólo se detectó la presencia del gen *bla<sub>TEM</sub>* en cinco cepas, de las cuales, tres se ubicaron en el fenotipo I. De acuerdo con los resultados obtenidos, los genes *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>SHV</sub>* no son los principales responsables de conferir resistencia a los  $\beta$ -lactámicos, razón por la cual, se recomienda investigar otros genes que codifiquen para dicha resistencia.

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
<b>Guzmán, Militza</b>	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8 954 225
	e-mail	miltzaguz@yahoo.com
	e-mail	
<b>Salazar, Elsa</b>	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	10 460 717
	e-mail	elsazul2003@yahoo.com
	e-mail	
<b>Rodulfo, Hectorina</b>	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	11 831 659
	e-mail	hrodulfo2002@yahoo.es
	e-mail	
	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2013	02	22

Lenguaje: spa

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS-Hernandezc.DOC	Aplication/ Word

**Alcance:**

**Espacial:** Universal

**Temporal:** temporal

**Título o Grado asociado con el trabajo:** Licenciado en Bioanálisis

**Nivel Asociado con el Trabajo:** Licenciatura

**Área de Estudio:** Bioanálisis

**Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:**  
Universidad de Oriente

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano  
**Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ**  
Vicerrector Académico  
Universidad de Oriente  
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
SISTEMA DE BIBLIOTECA  
RECIBIDO POR *Mazley*  
FECHA *5/8/09* HORA *5:30*

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

*JUAN A. BOLANOS CUNTELO*  
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/manuja

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009):** “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.



**Autor  
Hernández Carlos**

  
**Asesor  
Guzmán Militza**